

学校编码: 10384  
学号: 21120051302190

分类号\_\_\_\_密级\_\_\_\_  
UDC\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

三种虾蟹 Cyclin B 的定位和分子克隆

Localization and clone of Cyclin B from three kinds of  
crab and shrimps

虞 晋 晋

指导教师姓名: 黄辉洋 副教授

专 业 名 称: 海 洋 生 物

论文提交日期: 2008 年 9 月

论文答辩时间: 2008 年 10 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: 李少菁 教授

评 阅 人: 李少菁 教授

黎中宝 教授

2008 年 10 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于        年        月        日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年        月        日

# 目录

缩略词中英文对照表.....	A1
中文摘要.....	1
英文摘要.....	4
<b>第一章 细胞周期蛋白研究进展</b> .....	7
<b>第一节 细胞周期的调控</b> .....	7
1.1 细胞周期简介.....	7
1.2 细胞周期的调控原理.....	7
<b>第二节 细胞周期蛋白的种类</b> .....	12
<b>第三节 水生动物细胞周期蛋白研究进展</b> .....	13
3.1 细胞周期蛋白和卵子发生.....	13
3.2 细胞周期蛋白和早期胚胎发育.....	16
3.3 展望.....	17
<b>第四节 技术路线、目的和意义</b> .....	18
<b>第二章 拟穴青蟹精巢 Cyclin B 的免疫定位</b> .....	20
<b>第一节 材料</b> .....	20
1.1 实验动物.....	20
1.2 主要试剂.....	20
<b>第二节 方法</b> .....	22
2.1 切片的制备.....	22
2.2 免疫组化.....	22
<b>第三节 结果</b> .....	24
<b>第四节 讨论</b> .....	26
<b>第三章 长毛明对虾和凡纳滨对虾 Cyclin B 基因的分子克隆</b> .....	28
<b>第一节 材料</b> .....	28
1.1 实验动物.....	28

1.2 菌株	28
1.3 试剂	28
1.4 主要试剂配制	28
1.5 PCR 引物	29
<b>第二节 实验方法</b>	<b>31</b>
2.1 长毛明对虾和凡纳滨对虾卵巢总 RNA 的提取	31
2.2 长毛明对虾和凡纳滨对虾 <i>Cyclin B</i> 基因片段的克隆	31
2.3 3' RACE 扩增长毛明对虾和凡纳滨对虾 <i>Cyclin B</i> 基因	38
2.4 5' RACE 扩增长毛明对虾和凡纳滨对虾 <i>Cyclin B</i> 基因	41
2.5 生物信息学分析	44
<b>第三节 结果</b>	<b>44</b>
3.1 长毛明对虾和凡纳滨对虾卵巢总 RNA 的提取	44
3.2 长毛明对虾和凡纳滨对虾 <i>Cyclin B</i> 基因片段的获取	46
3.3 长毛明对虾和凡纳滨对虾 <i>Cyclin B</i> 基因的 3' RACE 结果	49
3.4 长毛明对虾和凡纳滨对虾 <i>Cyclin B</i> 基因的 5' RACE 结果	53
3.5 长毛明对虾和凡纳滨对虾 <i>Cyclin B</i> 基因全长 cDNA 序列	56
3.6 长毛明对虾和凡纳滨对虾 <i>Cyclin B</i> 序列同源性分析	59
3.7 <i>Cyclin B</i> 基因系统发育分析	67
<b>第四节 讨论</b>	<b>69</b>
4.1 <i>Cyclin B</i> 基因具有不同的序列一致性	69
4.2 <i>Cyclin B</i> 基因的保守性和细胞周期蛋白盒	69
4.3 <i>Cyclin B</i> 蛋白在细胞中的定位	70
<b>结语</b>	<b>71</b>
<b>参考文献</b>	<b>74</b>
<b>在学期间参加的科研项目及成果</b>	<b>83</b>
<b>致谢</b>	<b>84</b>

# CONTENTS

<b>Abbreviation</b> .....	A1
<b>Abstract in Chinese</b> .....	1
<b>Abstract in English</b> .....	4
<b>Chapter 1 Review on the Study of Cyclins</b> .....	7
<b>Section 1 Regulation of cell cycle</b> .....	7
1.1 Introduction of cell cycle.....	7
1.2 Regulation mechanism of cell cycle.....	7
<b>Section 2 Types of Cyclins</b> .....	12
<b>Section 3 Functions of Cyclins</b> .....	13
3.1 Cyclins and oogenesis.....	13
3.2 Cyclins and development of early embryos.....	16
3.3 Prospect.....	17
<b>Section 4 Technology, Aim and significance</b> .....	18
<b>Chapter 2 Immunolocalisation of Cyclin B in tests of <i>Scylla paramamosain</i></b> .....	20
<b>Section 1 Materials</b> .....	20
1.1 Experimental animals.....	20
1.2 Chemicals.....	20
<b>Section 2 Methods</b> .....	22
2.1 Preparation of slices.....	22
2.2 Immunohistochemistry.....	22
<b>Section 3 Results</b> .....	24
<b>Section 4 Discussions</b> .....	26
<b>Chapter 3 Clone of Cyclin B from <i>Penaeus penicillatus</i> and <i>Penaeus vannamei</i></b> .....	28

<b>Section 1 Materials</b>	28
1.1 Experimental animals	28
1.2 Bacterial strain	28
1.3 Chemicals	28
1.4 Preparations of Chemicals	28
1.5 PCR Primers	29
<b>Section 2 Methods</b>	31
2.1 Extraction of total RNA	31
2.2 Clone of <i>Cyclin B</i> fragment	31
2.3 3' RACE	38
2.4 5' RACE	41
2.5 Bioinformation analysis	44
<b>Section 3 Results</b>	44
3.1 Extraction of total RNA	44
3.2 Results of <i>Cyclin B</i> fragment	46
3.3 3'RACE results	49
3.4 5'RACE results	53
3.5 Full-length of <i>Cyclin B</i>	56
3.6 Homologous analysis of <i>Cyclin B</i>	59
3.7 Development of <i>Cyclin B</i>	67
<b>Section 4 Discussions</b>	69
4.1 Different homology of <i>Cyclin B</i> between different species	69
4.2 Conservation of <i>Cyclin B</i> and Cyclin Box	69
4.3 Location of Cyclin B	70
<b>Summary</b>	71
<b>References</b>	74
<b>Achievements</b>	83
<b>Acknowledgements</b>	84

缩略词中英文对照表

缩略词	英文全称	中文全称
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	基本局域联配搜寻工具
bp	Base pair	碱基对
cDNA	Complementary DNA	互补脱氧核糖核酸
DAB	3,3-diaminobenzidine terehydrochloride	3, 3' -二氨基联苯胺四盐酸盐
DDW	Double distilled water	双蒸水
DEPC	Diethyl cyanophosphonate	焦碳酸二乙酯
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
dNTP	Deoxyribonucleoside triphosphate	脱氧核糖核苷三磷酸
DTT	Dithiothreitol	二硫苏糖醇
EB	Ethidium bromide	溴化乙锭
EDTA	Ethylene diaminetetra-acetic acide	乙二胺四乙酸
hr	Hour	小时
Kb	Kilobase	千碱基
Da	Dalton	道尔顿
LB	Luria-Bertani medium	LB 培养基
min	Minute	分钟
mRNA	Messenger ribonetic acid	信使 RNA
NCBI	National Center for Biotechnology Information	美国国家生物信息中心
OD	Optical density	光密度
ORF	Open reading frame	开放阅读框
PBS	Phosphate-Buffered Saline	磷酸缓冲盐溶液
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应



缩略词中英文对照表

pI	Isoelectric point	等电点
Rpm	Revolutions per minute	转每分钟
RACE	Rapid amplification of cDNA ends	快速扩增 cDNA 末端
RT-PCR	Reverse transcript-PCR	反转录 PCR
SABC	Strept Avidin-Biotin Complex	链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶复合物
sec	Second	秒
SMART	Switching mechanism at 5' end of RNA transcript	RNA 转录本 5' 末端转换机制
TAE	Tris-acetic acide-EDTA buffer	Tris-乙酸 EDTA 缓冲液
Thr	Threonine	苏氨酸
Tris	Tris hydroxymethyl aminomethane	三羟甲基氨基甲烷
Tm	Melting temperature	退火温度
Tyr	Tyrosine	酪氨酸

## 中文摘要

生物的生长发育需要对细胞周期进行精确协调的时空调控，而细胞周期蛋白 (Cyclin) 是细胞周期的推动力。细胞周期蛋白有多种，Cyclin B 为其中一种，与催化亚基 cdc2 组成全酶复合物，即成熟促进因子 (MPF)，参与细胞分裂的多个事件的发生和进行。本文采用免疫组化方法和分子生物学技术，在拟穴青蟹的精巢中定位了 Cyclin B 蛋白，克隆了长毛明对虾和凡纳滨对虾卵巢 Cyclin B 基因，从而为甲壳类生殖调控机制的研究及水产养殖的发展提供基础资料。主要结果如下：

### 1 拟穴青蟹精巢 Cyclin B 的免疫组化定位

运用组织学和免疫细胞化学的方法，确定了所选拟穴青蟹精巢的成熟程度，并对拟穴青蟹精巢 Cyclin B 蛋白进行定位。在所选拟穴青蟹的精巢组织中，Cyclin B 蛋白主要分布在精母细胞期，直至精子细胞仍然存在。Cyclin B 蛋白在精母细胞中大量表达，在精子细胞少量，出现阳性的精母细胞的染色质有的浓缩成团，反之则成染色质丝，其中浓缩成团的精母细胞的阳性结果更为明显。上述结果表明：在拟穴青蟹精子发生过程中，Cyclin B 表达和蛋白定位具有发育阶段依赖性的特征。阴性对照组未出现阳性信号。

### 2 长毛明对虾和凡纳滨对虾 Cyclin B 基因的克隆和分析

运用分子生物学技术，分别研究长毛明对虾和凡纳滨对虾卵巢 Cyclin B 基因，结果如下：

#### ① 分别克隆长毛明对虾和凡纳滨对虾卵巢 Cyclin B 基因

通过已知物种的 Cyclin B 序列，包括埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*, GeneBank 登陆号: XM\_001660578)、丽蝇蛹集金小蜂 (*Nasonia vitripennis*, GeneBank 登陆号: XM\_001605776)、日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*, GeneBank 登陆号: AY769095)、溞 (*Daphnia pulex*, Joint Genome Institute, JGI)，设计一对简并引物 BFP 和 BRP，扩增出了长毛明对虾和凡纳滨对虾 Cyclin B 基因的片段。根据已得到序列片段设计引物，利用 cDNA 末端快速扩增和基因克

隆等分子生物学技术，分别克隆出长毛明对虾和凡纳滨对虾 *Cyclin B* 基因的全长 cDNA 序列，推导出其氨基酸序列，并提交给 GeneBank。

长毛明对虾的 *Cyclin B* 序列全长为 1927bp，含有一个完整的开放阅读框，长 1428bp，编码的成熟肽有 475 个氨基酸组成，其理论分子量为 54763.7Da，等电点为 6.19，推测该成熟肽有 6 个可能的氨基酸磷酸化位点，不具信号肽。分析该蛋白可能定位于细胞核内。

凡纳滨对虾的 *Cyclin B* 序列全长为 2326bp，含有一个完整的开放阅读框，长 1803bp，编码的成熟肽有 600 个氨基酸组成，其理论分子量为 69688.0Da，等电点为 6.32，推测该成熟肽有 9 个可能的氨基酸磷酸化位点，不具信号肽。分析该蛋白可能定位于细胞核内。

## ② 长毛明对虾和凡纳滨对虾 *Cyclin B* 同源性分析

推测长毛明对虾演绎的 *Cyclin B* 蛋白有两个拷贝的氨基酸保守区，分别位于 248-333 和 341-427 位氨基酸之间，属于细胞周期蛋白超家族（*Cyclin Superfamily*），是细胞周期蛋白盒（*Cyclin box*）的折叠区域。每个拷贝里面都有两个结合位点，第一个结合位点包括 9 个氨基酸位点，第二个结合位点包括 6 个氨基酸位点，为与 CDK、DNA 结合提供识别位点和折叠区域，在细胞周期和翻译过程中起调节作用。长毛明对虾 *Cyclin B* 基因与日本囊对虾（*Marsupenaeus japonicus*）的同源性高达 93%，而与中华绒螯蟹（*Eriocheir sinensis*）、帽贝（*Patella vulgata*）、斑纹蚌（*Dreissena polymorpha*）、大西洋浪蛤（*Spisula solidissima*）、水螅（*Hydra viridis*）分别有 71%、61%、60%、59%、57% 的同源性。

推测凡纳滨对虾演绎的 *Cyclin B* 蛋白有一个拷贝的氨基酸保守区，该氨基酸保守区位于 367-458 位的氨基酸，属于细胞周期蛋白超家族，氨基酸保守区里包含两个结合位点，第一个结合位点包括 2 个氨基酸位点，第二个结合位点包括 5 个氨基酸位点，为与 CDK、DNA 结合提供识别位点和折叠区域，在细胞周期和翻译过程中起调节作用。凡纳滨对虾 *Cyclin B* 基因与其它特种的 *Cyclin B* 具有不同的序列一致性。与日本囊对虾的同源性达 91%，而与中华绒螯蟹、帽贝、斑纹蚌、大西洋浪蛤、水螅、绿海胆的同源性分别为 71%、62%、61%、59%、57%、48%。

## ③ *Cyclin B* 基因系统发育分析

系统发育分析, 将克隆的长毛明对虾和凡纳滨对虾的 *Cyclin B* 基因与其它物种的 *Cyclin B* 基因归为同一类群, 且在近缘物种间有较高的保守性, 如日本囊对虾和中华绒螯蟹。

关键词: *Cyclin B*; 拟穴青蟹; 长毛明对虾; 凡纳滨对虾

厦门大学博硕士论文摘要库

## Abstract

The growth and development of livings needs accurate and coordinate spatiotemporal regulation. The Cyclins are the promoter of cell-cycle. There are many kinds of Cyclins and Cyclin B is one of them, which combines with catalytic subunit cdc2 to form holoenzyme, MPF. MPF is involved in many events during the start and processing of cell cycle.

In this study, Cyclin B has been located in the testes of *Scylla paramamosain*, and cloned from the ovary of *Penaeus penicillatus* and *Penaeus vannamei* using the immunohistochemical and molecular method. Basic information for the regulated mechanism of reproduction and aquaculture will be provided according to the research.

### 1. Characteristics of Cyclin B protein localization in testes of *Scylla paramamosain* using immunohistochemistry

The maturation degree of testes of *Scylla paramamosain* can be divided into five stages as follows: spermatogonium stage, spermatocyte stage, spermatid stage, sperm stage and resting stage. Choose the testes in the spermatocyte stage and using histological and immunohistochemical methods to ascertain the maturation degree of the testes from *Scylla paramamosain*. According to the results, Cyclin B is strongly expressed during spermatocyte stage and weakly expressed in spermatid stage. During spermatocyte stage, positive results are clearer in the cells whose chromatin is more condensed. The expression and localization of Cyclin B depend on the maturation degree in the spermatogenesis of *Scylla paramamosain*. The control result is negative.

### 2. The Cyclin B gene are cloned in the ovary of *Penaeus penicillatus* and *Penaeus vannamei*

The molecular methods are used in the research of the Cyclin B gene in the ovary of *Penaeus penicillatus* and *Penaeus vannamei*.

#### ① Full-length cDNA sequences of Cyclin B in the ovary of *Penaeus*

### ***Penicillatus* and *Penaeus vannamei* are obtained**

To design a pair of degenerate primers BFP and BRP out of the alignment of published *Cyclin B* of other species, including *Aedes aegypti* (GeneBank ID: XM\_001660578), *Nasonia vitripennis* (GeneBank ID: XM\_001605776)、*Marsupenaeus japonicus* (GeneBank ID: AY769095)、*Daphnia pulex* (Joint Genome Institute, JGI). The *Cyclin B* fragment of the two species is obtained using BFP and BRP. According to the known sequences of *Cyclin B* fragment to design primers for RACE, using SMART cDNA cloning methods to clone the full-length of *Cyclin B*. Then submit *Cyclin B* to GeneBank.

The full-length of *Cyclin B* in the ovary of *Penaeus Penicillatus* is 1927bp, containing a single open reading frame (ORF) of 1428bp which encodes a putative *Cyclin B* protein of 475 amino acids. The predicted protein has a calculated molecular weight of 54763.7 Da and a Theoretical pI of 6.19 as well as 6 phosphorylation sites, but no signal peptide. The protein is predicted to locate in the nuclear.

The full-length of *Cyclin B* in the ovary of *Penaeus vannamei* is 2326bp, containing a single open reading frame (ORF) of 1803bp which encodes a putative *Cyclin B* protein of 600 amino acids. The predicted protein has a calculated molecular weight of 69688.0 Da and a Theoretical pI of 6.32 as well as 9 phosphorylation sites, but no signal peptide. The protein is predicted to locate in the nuclear.

### **② The analysis of homologous of *Cyclin B* in the ovary of *Penaeus Penicillatus* and *Penaeus vannamei***

As ascertained by NCBI Conserved Domain Search, the putative *Cyclin B* protein of *Penaeus Penicillatus* contains two copies of conserved regions locating at 248-333 amino acids and 341-427 amino acids respectively, which belongs to the *Cyclin* Superfamily and is the fold region of *Cyclin* box. There are two binding sites in each copy of the *cyclin* box, the first contains 9 amino acids and the second contains 6 amino acids. The identity during the *Penaeus Penicillatu* and

*Marsupenaeus japonicus*, *Eriocheir sinensis*, *Patella vulgate*, *Dreissena polymorpha*, *Spisula solidissima*, *Hydra viridis* are 93%, 71%, 61%, 60%, 59%, 57%, respectively.

As ascertained by NCBI Conserved Domain Search, the putative Cyclin B protein of *Penaeus vannamei* contains one copy of conserved region locating at 367-458 amino acids, which belongs to the Cyclin Superfamily and is the fold region of Cyclin box. There are two binding sites in each copy of the cyclin box, the first contains 2 amino acids and the second contains 5 amino acids. The identity during the *Penaeus vannamei* and *Marsupenaeus japonicus*, *Eriocheir sinensis*, *Patella vulgate*, *Dreissena polymorpha*, *Spisula solidissima*, *Hydra viridis*, *Lytechinus variegatus* are 91%, 71%, 62%, 61%, 59%, 57%, 48%, respectively.

### ③ The analysis of phylogenetic relationship of Cyclin B

Amino acid sequence alignment using clustalW software reveals that the putative Cyclin B from the ovary of *Penaeus Penicillatus* and *Penaeus vannamei* exhibits a relatively degree of sequence similarity with previously reported Cyclin B from other species, and there are high degree of sequence similarity during the relative species, such as *Marsupenaeus japonicus* and *Eriocheir sinensis*.

Key words: Cyclin B; *Scylla paramamosain*; *Penaeus Penicillatus*; *Penaeus vannamei*.

## 第一章 细胞周期蛋白的研究进展

### 第一节 细胞周期的调控

#### 1.1 细胞周期简介

细胞分裂是一切生物机体生长、发育、生殖和遗传的基础。一般生物细胞从一次有丝分裂结束到下一次有丝分裂完成所经历的整个过程即细胞周期。1882 年, Flemming 发现有丝分裂, 细胞周期的概念即被认为是分裂期及间期的周而复始<sup>[1]</sup>。1955 年, Howard 和 Pelc 用  $^{32}\text{P}$  标记蚕豆根尖的经典工作, 确定细胞周期是由  $G_1$ 、S、 $G_2$ 、M 期组成<sup>[2]</sup>。在细胞周期中, 最主要的事件是遗传信息的载体 DNA 复制成两份拷贝, 将两份拷贝分配到两个子代细胞内。由此, 细胞周期可划分为 DNA 合成期 (S 期)、姐妹染色体均匀分配到两个子细胞中去 (M 期), M 期结束后 S 期开始前的间隙称为  $G_1$  期, S 期结束后和 M 期开始前的间隙称为  $G_2$  期<sup>[3]</sup>。

#### 1.2 细胞周期的调控原理

生物的生长发育需要对细胞周期进行精确协调的时空调控。细胞周期有条不紊地进行, 依赖于以细胞周期蛋白 (Cyclins) — 周期蛋白依赖性蛋白激酶 (Cyclin-dependent kinase, CDKs) — 周期蛋白依赖性蛋白激酶的抑制蛋白 (CDK inhibitor, CKI) 为中心的细胞周期网络的精密调控。细胞周期运行的动力主要来自周期蛋白依赖性蛋白激酶, 它的活性则通过周期蛋白和周期蛋白依赖性蛋白激酶的抑制蛋白进行控制。细胞周期调控的方式有两种: ①正调控, 在满足细胞周期某些特定阶段的生长条件后细胞周期才能进行; ②负调控, 保证细胞周期运行质量的检查机制, 只有当异常事件出现时这类调节机制才被激活, 被称为细胞周期检查点。在细胞周期的不同时期, 不同类型的细胞周期蛋白发生程序性合成与降解, 与不同的 CDK 结合成 Cyclin-CDK 复合物, 构成细胞周期调控的分子调控部分, 包括①质的控制, 主要指蛋白质的磷酸化状态和在细胞内空间位置的控制; ②量的控制, 指蛋白质的表达和降解。

细胞周期蛋白依赖性激酶通过启动并磷酸化特定的蛋白质, 改变蛋白质的



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库